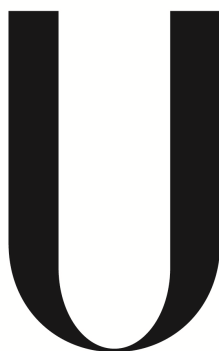


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Modulação da Biodisponibilidade do Monóxido de Azoto no
Eritrócito - Avaliação do Efluxo de GSNO e do Efeito do Timolol**

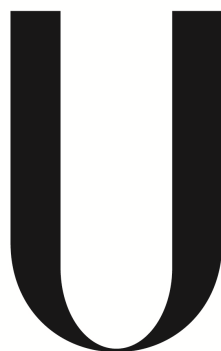
Pedro Miguel Araújo Guerreiro Teixeira

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Modulação da Biodisponibilidade do Monóxido de Azoto no
Eritrócito - Avaliação do Efluxo de GSNO e do Efeito do Timolol**

Dissertação orientada pela Professora Doutora Carlota Saldanha (Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Instituto de Medicina Molecular, Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação) e pela Doutora Deodália Dias (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Animal).

Pedro Miguel Araújo Guerreiro Teixeira

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2013

Agradecimentos

À Professora Doutora Carlota Saldanha manifesto o maior reconhecimento pela orientação, apoio e disponibilidade permanentes que permitiram a concretização deste trabalho.

Agradeço também a orientação e acompanhamento da Doutora Deodália Dias, e o enorme apoio da Patrícia Napoleão em todo o desenvolvimento deste projecto.

Resumo

O monóxido de azoto (NO) tem sido amplamente estudado e relacionado com inúmeros processos e patologias no sistema cardiovascular, sendo actualmente reconhecido como um potente regulador do tónus vascular e da hemorreologia. Após a sua formação nas células endoteliais vasculares, o NO: (1) difunde-se para os eritrócitos, onde afecta a agregação e deformabilidade eritrocitárias; (2) difunde-se para a parede vascular onde provoca o relaxamento das células musculares lisas, o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos e do fluxo sanguíneo e, consequentemente, conduz à redução da pressão arterial. O metabolismo de NO no eritrócito origina diversos metabolitos, que podem sofrer alterações dependentes de estímulos externos e internos como a acetilcolina (ACh), substrato natural da acetilcolinesterase (AChE). O glutatião é uma molécula abundante no interior dos eritrócitos, formando nitrosoglutatião (GSNO) ao reagir com o NO. A ligação da ACh à AChE, na membrana do eritrócito, inicia um mecanismo de tradução de sinal que envolve as proteínas Gi e banda 3, estimulando o efluxo de NO. Na presença de velnacrina, um inibidor da AChE, a biodisponibilidade do NO é preservada, i.e., não ocorrem alterações no efluxo de NO. O timolol é um inibidor da AChE.

O primeiro objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do timolol na mobilização interna do NO eritrocitário, em condições fisiológicas normais. O segundo objetivo foi averiguar se ocorre efluxo de GSNO concomitante com a saída de NO do eritrócito, após estimulação com efectores da AChE. Para atingir estes objetivos foi estudado o efeito *in vitro* de moduladores da AChE – ACh e timolol – no NO e nos seus metabolitos – GSNO, S-nitrosohemoglobina (SNO-Hb) e peroxinitritos. Foi colhido sangue por punção venosa de dadores saudáveis (n=18). Para cada amostra de sangue foram preparadas suspensões de eritrócitos incubadas respectivamente com ACh e timolol numa concentração final de 10µM. Foram quantificados os níveis de efluxo de NO, SNO-Hb, peroxinitritos e GSNO.

Na presença de timolol, o efluxo de NO no eritrócito é semelhante ao da amostra de controlo, mas significativamente reduzido quando comparado com a amostra contendo ACh. A presença de timolol induz uma redução significativa, no eritrócito, dos níveis de GSNO por comparação com as amostras de controlo e ACh. Os níveis de SNO-Hb e peroxinitritos não são alterados na presença de timolol ou ACh. A ACh e o timolol induzem o efluxo significativo de GSNO, quando comparadas com as amostras de controlo, mas os valores são significativamente reduzidos na presença de timolol quando comparado com as amostras incubadas contendo ACh. É possível concluir que o NO no eritrócito é mantido pelo timolol, *in vitro*. Pode ser expectável um

papel semelhante na microcirculação ocular, quando aplicado como composto terapêutico. Conclui-se igualmente que ocorre o efluxo de GSNO concomitante com a saída de NO, após estimulação com ACh e timolol. Este estudo contribui para aprofundar o conhecimento do metabolismo de NO no eritrócito e, possivelmente, para aplicação de novas terapêuticas com GSNO.

Palavras-chave:

Eritrócito

Acetilcolina

Acetilcolinesterase

Nitrosoglutatão

Timolol

Abstract

Nitric oxide (NO) has been widely studied and related to several processes and pathologies in the cardiovascular system, and is recognized as a potent regulator of muscular tone and hemorheology. After formation in the endothelial cells, NO: (1) spreads into erythrocytes, regulating erythrocyte aggregation and deformability; (2) spreads into the vascular wall where it causes relaxation of smooth muscular cells, increase in blood vessels diameter and rise of blood flow and, consequently, arterial pressure decrease. NO metabolism inside the erythrocyte generates several derivatives, which can be altered by external and internal stimuli such as acetylcholine (ACh), natural substrate of acetylcholinesterase (AChE). Glutathione is an abundant molecule inside erythrocyte, originating S-nitrosoglutathione (GSNO) by reacting with NO. Binding of ACh to AChE, in the erythrocyte membrane, initiates a signal transduction mechanism that involves Gi and band 3 proteins, stimulating NO efflux. In the presence of velnacrina maleate, an AChE inhibitor, NO bioavailability is preserved, i.e., no changes in NO efflux occur. Timolol is an erythrocyte AChE inhibitor.

The first objective of this research was to evaluate the effect of timolol in the internal mobilization of erythrocyte NO, under normal physiological conditions. The second objective was to evaluate the efflux of GSNO, concomitant with the efflux of NO, after stimulation with AChE effectors. To achieve these goals, the *in vitro* effect of AChE modulators – ACh and timolol – in NO and its metabolites - GSNO, S-nitrosohemoglobin (SNO-Hb) and peroxynitrites - were studied. Venous blood samples were collected from eighteen healthy Caucasian men. For each blood sample, erythrocyte suspension were performed and incubated with ACh and timolol maleate in order to achieve 10µM final concentration. Levels of NO efflux, SNO-Hb, peroxynitrites and GSNO were determined.

NO efflux by the erythrocyte in presence of timolol is similar to the control sample but significantly decreased when compared to the sample with ACh. The presence of timolol induces significant decrease, in the erythrocyte, of GSNO levels in relation with the control and with ACh samples. SNO-Hb and peroxynitrites levels were not altered by the presence of timolol or ACh. Both timolol and ACh induced significant GSNO efflux in the erythrocyte when compared to the control sample, but values are significantly decreased in the presence of timolol when compared with ACh. In conclusion, the NO content in the erythrocyte is maintained by timolol maleate, *in vitro*. It may be expected the same role for timolol in the ocular microcirculation when applied as a therapeutic compound. In addition, when stimulated with ACh or timolol, GSNO

efflux occurs, associated with NO efflux. This brings new insight to the metabolism of NO inside the erythrocyte and new possible therapeutic applications for GSNO.

Keywords:

Erythrocyte

Acetylcholine

Acetylcholinesterase

S-Nitrosoglutathione

Timolol

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Eritrócitos.....	1
1.2 Membrana do Eritrócito.....	2
1.2.1 Proteínas	2
1.2.2 Lípidos	4
1.3 Função Endotelial	4
1.4 Monóxido de Azoto	5
1.4.1 Nitritos e Nitratos.....	6
1.4.2 S-nitrosohemoglobina	7
1.4.3 Peroxinitritos	7
1.4.4 Nitrosoglutatão	8
1.5 Acetilcolina e Acetilcolinesterase	8
1.6 Timolol.....	11
2. Objectivos.....	12
3. Material.....	13
3.1 Equipamentos e material	13
3.2 Reagentes	13
4. Modelo Experimental.....	14
4.1 Protocolo de colheita de sangue	14
4.2 Preparação da Suspensão de Eritrócitos	14
4.3 Modelo Experimental	14
5. Procedimento Experimental.....	16
5.1 Determinação da Concentração do NO Eritrocitário.....	16
5.2 Determinação da SNO-Hb	16
5.3 Determinação de GSNO intra e extra celular.	17
5.4 Determinação de Peroxinitritos	18
5.5 Análise Estatística.....	18
6. Resultados.....	20

6.1 Determinação da Concentração do NO Eritrocitário	20
6.2 Determinação da Concentração de SNO-Hb	21
6.3 Determinação da Concentração de Peroxinitritos	21
6.4 Determinação da Concentração de GSNO eritrocitário	22
6.5 Determinação da Concentração de GSNO - efluxo	23
6.6 Determinação da Concentração de GSNO eritrocitário + efluxo	24
6.6 Correlação entre efluxo de GSNO e NO.	24
 7. Discussão	 26
7.1 Avaliação do efeito do timolol no metabolismo do NO eritrocitário.	26
7.2 Avaliação do efluxo de GSNO eritrocitário	28
 8. Considerações Finais	 31
 9. Referências Bibliográficas	 32
 Anexos	 40
Anexo I - Concentrações de monóxido de azoto e seus metabolitos para os ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	40
Anexo II - Valores de mediana e quartis para os ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	40

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama simplificado da estrutura da membrana do eritrócito.....	2
Figura 2. Hipótese para o possível papel da AChE no mecanismo de tradução de sinal, em resposta à acção da ACh, nos níveis de produção de nitritos e nitratos, em suspensões de eritrócitos humanos.	10
Figura 3. Valores da mediana de NO (nM) para ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M)	20
Figura 4. Valores da mediana de SNO-Hb para ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	21
Figura 5. Valores da mediana de Peroxinitritos para ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	22
Figura 6. Valores da mediana de GSNO eritrocitário (μ M) para ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	22
Figura 7. Valores da mediana de GSNO - efluxo (μ M) para ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	23
Figura 8. Valores da mediana de GSNO eritrocitário (μ M) + efluxo (μ M) para ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	24
Figura 9. Correlação entre valores da mediana de efluxo de GSNO (μ M) e NO (nM) para ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).	25

Lista de abreviaturas:

ACh – Acetilcolina, do inglês *Acetylcholine*

AChE – Acetilcolinesterase, do inglês *Acetylcholinesterase*

DAF-2 – 4,5-diaminofluoreceína, do inglês *4,5 – diaminofluorecein*

DFC-DA – 2,7- diclorofluoresceína diacetato, do inglês *2',7'-dichlorfluorescein diacetate*

GSNO – Nitrosoglutatíão, do inglês *S-Nitrosoglutathione*

NO – Monóxido de Azoto, do inglês *Nitric Oxide*.

NOS – Monóxido de Azoto Sintase, do inglês *Nitric Oxide Synthase*

SNO – Hb – S-nitrosohemoglobina, do inglês *S-nitrosohemoglobin*.

SPSS – Pacote Estatístico Para as Ciências Sociais, do inglês *Software Statistical Package for the Social Sciences*

1. Introdução

1.1 Eritrócitos

Os principais constituintes do sangue são os eritrócitos, os leucócitos, as plaquetas e o plasma, que desempenham funções essenciais de transporte, protecção e regulação (Alberts *et al.*, 2002; Guyton *et al.*, 2006).

De entre estes, os eritrócitos são os mais abundantes. Apresentam a forma de discos bicôncavos bastante deformáveis, delimitados por uma membrana com cerca de 7,8 µm de diâmetro e com um tempo de vida de 120 dias. Em condições fisiológicas normais o número médio destas células, por mm³, varia entre os 5.200.000 para os homens e 4.700.00 para as mulheres (Alberts *et al.*, 2002; Guyton *et al.*, 2006). A função mais importante dos eritrócitos consiste no transporte de hemoglobina, proteína responsável por conduzir oxigénio dos pulmões para os tecidos, e de monóxido de azoto (NO). No organismo humano, de modo a manter função na circulação sanguínea, a hemoglobina tem de existir no interior dos eritrócitos, enquanto em certos animais inferiores a hemoglobina circula como uma proteína livre (Guyton *et al.*, 2006).

Outra das funções do eritrócito está relacionada com a presença, em grandes quantidades, da anidrase carbónica, um enzima que catalisa a reacção reversível entre a água e o dióxido de carbono para formação de ácido carbónico (H₂CO₃). Este enzima permite aumentar a velocidade desta reacção, o que possibilita o transporte de CO₂ sob a forma de ácido carbónico dos tecidos para os pulmões – onde é novamente reconvertido em CO₂ e expelido (Guyton *et al.*, 2006).

A diferenciação dos eritrócitos tem início na medula óssea, onde as células-tronco hematopoiéticas se diferenciam em eritrócitos nucleados. Em seguida, após a extrusão do núcleo e degradação do retículo endoplasmático, ocorre a formação de reticulócitos que, em circulação, evoluem para eritrócitos maduros (Pasini *et al.*, 2006). A composição bioquímica dos eritrócitos e a sua morfologia não são homogéneas, mas variam com a sua idade. Tal característica traduz-se numa maior inibição da biodisponibilidade de NO nos eritrócitos mais velhos (Owusu *et al.*, 2013).

1.2 Membrana do Eritrócito

Com funções de separação dos meios intra e extracelular, bem como selecção de substâncias – nutrientes, iões ou gases - a membrana celular do eritrócito é composta por 39,5% de proteínas, 35,1% de lípidos, 5,8% de hidratos de carbono e água, sendo formada por uma dupla camada lipídica com várias proteínas associadas (Yawata, 2003; Guyton *et al.*, 2006).

1.2.1 Proteínas

O número total de proteínas presente nesta membrana é de 340 (Pasini *et al.*, 2006), que podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com a facilidade com que são separadas da membrana – integrais e periféricas. As proteínas integrais, como a banda 3 e as glicoforinas, estão inseridas na dupla camada lipídica e são difíceis de extrair experimentalmente, ao contrário das periféricas, como as espectrinas, que aparentam estar ligadas apenas a uma face da membrana (Oliveira e Saldanha, 2009) (ver Figura 1).

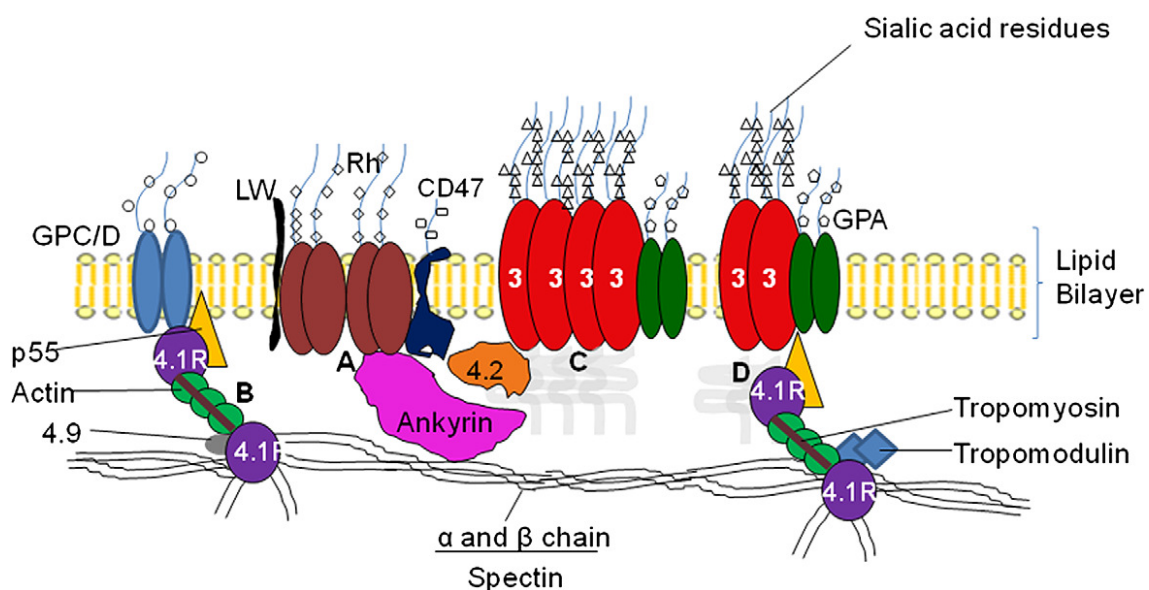


Figura 1. Diagrama simplificado da estrutura da membrana do eritrócito. (A) complexo Rh; (B) complexo proteína 4.1; (C) e (D) macro complexo banda 3 ((C) banda 3, forma tetramérica e (D) banda 3, forma dimérica). Retirado de Oliveira e Saldanha (2009).

As proteínas membranares podem ainda ser classificadas em termos funcionais, em três grupos: (1) proteínas integrais, que incluem as proteínas como a banda 3 e as glicoforinas; (2) proteínas que fazem parte do citoesqueleto (espectrinas, actina ou

proteína 4.1); (3) proteínas periféricas que se associam à membrana através de uma ligação em âncora, como a anquirina e a proteína 4.2 (Oliveira e Saldanha, 2009).

A proteína banda 3 apresenta dois domínios, o N- e o C-terminal, sendo a principal proteína integral da membrana do eritrócito com cerca de 10^6 cópias por célula. O domínio N-terminal é citoplasmático e é o principal local de ligação de diversas proteínas ao citoesqueleto, através de ligações em âncora, sendo por isso importante para a flexibilidade e rigidez do eritrócito. É neste domínio que se ligam a anquirina, proteínas 4.1 e 4.2, enzimas glicolíticas e a hemoglobina. O domínio C-terminal é responsável pela troca iônica e pela ligação com a anidrase carbônica II (Moriyama, *et al.*, 1993; Brunati *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2008; Oliveira e Saldanha, 2009.). A configuração da proteína banda 3 pode ser regulada através da fosforilação causada pela proteína tirosina cinase ou desfosforilação provocada pela proteína tirosina fosfatase, influenciando propriedades como a agregação eritrocitária, que aumenta com a fosforilação da banda 3 (Saldanha *et al.*, 2007).

As glicoforinas, devido à existência de ácido siálico na sua composição, contribuem em cerca de 60% para a carga negativa dos eritrócitos. Esta característica é crucial na modulação das interações entre os eritrócitos, entre estes e o endotélio ou outras células sanguíneas. Representam cerca de 2% das proteínas totais na membrana, sendo o seu principal constituinte a glicoforina A (Yawata, 2003). É conhecida a importância da relação entre a glicoforina e a proteína banda 3, sendo a última essencial para a estabilidade da primeira (Williamson *et al.*, 2008).

No eritrócito, o citoesqueleto está ligado à membrana através da interação entre proteínas, sendo a banda 3 e glicoforina D as principais responsáveis por esta ligação (An *et al.*, 1996). Um dos complexos formados é o macrocomplexo banda 3, em que a anquirina e a proteína 4.2 são responsáveis pela interação com o citoesqueleto (Yawata, 2003). A principal função da anquirina é a de criar uma forte ligação entre a espectrina e a banda 3, ligação esta que pode ser modulada pela fosforilação provocada pela proteína cinase A, adenosina monofosfato cíclica ou caseína cinase I (Kennedy *et al.*, 1991; Low *et al.*, 1991). A proteína 4.2 interage com a anquirina, participando na formação da estrutura do macrocomplexo banda 3, e tem ainda um papel importante na interação entre o macrocomplexo banda 3 e o complexo Rh, pelas suas interações com a proteína CD47 (Yawata, 2003).

A glicoforina D pode interagir com o complexo proteína 4.1 ou com o complexo de actina/espectrinas, existindo ainda outro ponto de ligação entre o citoesqueleto e a membrana, no qual a proteína 4.1 se liga à proteína banda 3 e à espectrina/actina. As interações entre a actina e espectrinas são mediadas pela proteína 4.1 e podem ser

alteradas pela fosforilação da proteína 4.1R, induzida pela adição da proteína cinase C (Low *et al.*, 1991; An *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2008).

A desoxigenação de eritrócitos resulta na deslocação de anquirina da banda 3 e conduz ao enfraquecimento das interações entre a membrana e o citoesqueleto. Este enfraquecimento, por breves períodos de desoxigenação, pode ser benéfico para a circulação sanguínea (Stefanovic *et al.*, 2013).

1.2.2 Lípidos

A membrana do eritrócito é composta por 60% de fosfolípidos, essencialmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélin e fosfatidilserina. Cerca de 30% dos lípidos da membrana do eritrócito são colesterol não esterificado e os restantes 10% são classificados como glicolípidos. Os lípidos estão distribuídos na membrana de forma assimétrica, característica responsável por um importante papel estrutural e funcional (Yawata, 2003; Oliveira e Saldanha, 2009).

A deformabilidade eritrocitária é uma importante característica relacionada não só com as proteínas da membrana, mas também com os lípidos, permitindo atravessar vasos e capilares sem perder a capacidade de restaurar a sua configuração normal (Uyuklu *et al.*, 2009; Babu *et al.*, 2009). A fluidez da membrana torna-se também de importância para as funções do eritrócito, sendo dependente de diversos factores como a classe de fosfolípidos, o grau de saturação dos ácidos gordos, o tipo de colesterol ou presença de compostos anfipáticos (Plasenzotti *et al.*, 2007). Os *lipid rafts* são microdomínios específicos da membrana celular, que apresentam um elevado nível de organização. Estão associados a vias de sinalização celular e a interações específicas com fármacos, sendo referidos como fulcrais na regulação de infecções de parasitas como a malária (Murphy *et al.*, 2006).

1.3 Função Endotelial

O endotélio é um tecido que separa o lúmen dos restantes tecidos corporais, com funções fisiológicas importantes: (1) regulação vasomotora; (2) resposta inflamatória, promovendo a migração de leucócitos do sangue para tecidos através da expressão de moléculas de adesão e citocinas; (3) função anticoagulante; (4) controlo das trocas de células, moléculas e do plasma entre tecidos corporais e o sangue; (5) prevenção da adesão de plaquetas e monócitos (Ley e Reutershan, 2006).

O endotélio é um elemento indispensável na regulação da homeostasia vascular, tendo sido demonstrado por Furchgott e Zawadzki (1980) que na ausência de células endoteliais, a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) não ocorre. Após a remoção completa de células endoteliais, quer por processos mecânicos ou enzimáticos, a ACh deixou de induzir qualquer relaxamento, provocando até o oposto a partir de certas concentrações (Furchgott e Zawadzki, 1980). Foi sugerido pelos mesmos autores que a ACh, actuando sobre os receptores muscarínicos das células endoteliais, estimula a libertação de uma substância que causa o relaxamento em células musculares lisas. Esta substância foi identificada mais tarde como o NO (Ignarro *et al.*, 1987).

A disfunção endotelial é caracterizada pelo aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio, que podem conduzir à redução da disponibilidade de síntese de NO por diversas vias – inactivação do NO pelo anião superóxido, com formação de peroxinitritos (Pryor *et al.*, 1995); redução da expressão e actividade da monóxido de azoto sintase (NOS) devido a alterações nos seus cofactores ou substratos; aumento da concentração de dimetilarginina assimétrica (De Gennaro Colonna *et al.*, 2009). A redução da disponibilidade de NO, e resultante disfunção endotelial, originam eventos que antecedem a formação da placa aterosclerótica – alterações do tónus vascular e início do processo inflamatório, com adesão de leucócitos, proliferação e migração de células musculares lisas (Madamanchi e Runge, 2013).

1.4 Monóxido de Azoto

Em 1998, o Prémio Nobel em Medicina ou Fisiologia foi entregue a Furchgott, Ignarro e Murad pelo seu trabalho na identificação do NO, até aí reconhecido como o factor de relaxamento do endotélio, um mediador biológico do sistema cardiovascular. Desde essa altura, o NO tem sido amplamente estudado e relacionado com inúmeros processos e patologias no sistema cardiovascular, sendo actualmente reconhecido como um potente regulador do tónus vascular e da hemorreologia. A disfunção vascular é a causa de uma importante variedade de patologias que incluem o enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica ou a hipertensão pulmonar (Madigan *et al.*, 2013). O NO assume-se igualmente como uma molécula crítica em situações de disfunção do eritrócito, que incluem a anemia falciforme, a hemoglobínúria paroxística nocturna, e ainda na utilização de sangue para transfusões (Khan *et al.*, 2013).

Além da sua função na regulação do tônus vascular, o NO é também responsável pela inibição da agregação de plaquetas, regulação da adesão celular, permeabilidade vascular, deformabilidade do eritrócito, (Mesquita *et al.*, 2001) diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios e limitação da proliferação de células musculares lisas (Alderton *et al.*, 2001; Devlin *et al.*, 2010).

O NO endotelial é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima sintase do NO (NOS); tem um tempo de vida inferior a 4 segundos em soluções biológicas, sendo extremamente reactivo. Três isoformas da NOS – neuronal (NOS1 ou nNOS), endotelial (NOS3 ou eNOS) e indutível (NOS2 ou iNOS) – foram identificadas como produtoras de NO. As primeiras duas são dependentes do cálcio enquanto a terceira pode ser induzida sob condições inflamatórias em diversas células, sendo independente do cálcio. Todas as formas metabolizam a L-arginina, NADPH e oxigénio em L-citrulina, NADP e NO (Alderton *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2013). As moléculas de NO sintetizado pelo NOS endotelial são consideradas a fonte dominante nos vasos sanguíneos (Moncada *et al.*, 2006).

Uma vez formado, o NO pode difundir-se para o interior do eritrócito, onde reage com a hemoglobina regulando a deformabilidade e agregação eritrocitárias (Cerwinka *et al.*, 2002; Bor-Kucukatay *et al.*, 2003). Ocorre também a difusão de NO para o exterior das células endoteliais onde, na parede vascular, reage com o grupo heme da guanilato ciclase, catalisadora da formação de guanosina monofosfato cíclica, que activa a proteína cinase G (Arnold *et al.*, 1977). Os mecanismos de transdução de sinal conduzem à desfosforilação das cadeias leves de miosina, que provocam o relaxamento do músculo liso vascular. Consequentemente, verifica-se o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, aumento de fluxo sanguíneo e redução da pressão arterial (Guyton *et al.*, 2006). Na região extra vascular, o NO pode inibir a respiração mitocondrial por se ligar ao grupo heme do citocromo C oxidase, regulando o fluxo de oxigénio entregue no tecido (Cooper *et al.*, 2008).

Sendo uma molécula instável e altamente reactiva, o NO reage com diversas moléculas originando derivados metabólicos mais estáveis que garantem a sua biodisponibilidade (Archer, 1993).

1.4.1 Nitritos e Nitratos

Apesar do seu reduzido tempo de meia-vida no interior do lúmen dos vasos sanguíneos, o NO formado é rapidamente convertido pela hemoglobina contida nos eritrócitos em nitratos e nitritos, compostos relativamente inertes (Robinson *et al.*, 2005). Os nitritos são considerados dos produtos metabólicos mais estáveis do NO,

tendo sido demonstrado que actuam como um reservatório que preserva a sua bioactividade e podendo ser enzimaticamente reduzidos a NO pela hemoglobina nitrito reductase sob condições de hipoxia. A actividade máxima da hemoglobina nitrito reductase ocorre para valores normais de P50 da hemoglobina - pressão parcial de O₂ que provoca a semi-saturação – devido ao balanço entre as actividades enzimáticas dos estados conformacional T (oxihemoglobina) e R (desoxihemoglobina) (Huang *et al.*, 2005).

Diversos estudos demonstraram que os nitritos actuam, de facto, como vasodilatadores em condições de hipoxia (Cosby *et al.*, 2003; Dejam *et al.*, 2007), sendo os eritrócitos considerados como o principal local de redução dos nitritos a NO (Che *et al.*, 2009).

1.4.2 S-nitrosohemoglobina

No eritrócito, o NO pode ligar-se à hemoglobina através do grupo heme – dando origem à nitrosil hemoglobina – ou através da cadeia β da cisteína formando a S-nitrosohemoglobina (SNO-Hb) (Gross e Lane, 1999). O NO liga-se à desoxihemoglobina para formar Fe²⁺NO, sendo o grupo NO depois transferido durante a oxigenação da hemoglobina do grupo ferroso para a posição 93 da cadeia β da cisteína da oxihemoglobina, dando origem à relativamente estável SNO-Hb. Em condições de hipoxia, a SNO-Hb sofre alterações alostéricas que resultam na transferência do NO para a proteína banda 3 presente na membrana, podendo o NO ser ainda transferido para o glutatião (Stamler *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 2007).

1.4.3 Peroxinitritos

Segundo Pryor e Squadrito (1995), o NO reage com o anião superóxido originando peroxinitritos que, por sua vez, podem produzir nitratos ou causar danos em proteínas, lípidos e carboidratos através de reacções de oxidação e nitrificação.

Outro estudo de Go e colaboradores (1999) refere a possibilidade do peroxinitrito ser uma molécula sinalizadora que participa na activação da proteína JNK (c-Jun N-terminal kinases), que determina a sobrevivência da célula em caso de stress ambiental.

1.4.4 Nitrosoglutatão

O nitrosoglutatão (GSNO) é uma molécula de baixo peso molecular pertencente a uma classe de moléculas designada por s-nitrosotióis, considerados como importantes moléculas sinalizadoras. Em animais, são mediadoras dos danos no fígado, (inchaço hepatocelular e danos nos cordões hepáticos) e sobrevivência durante infecções bacterianas (Singh *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2004).). O GSNO é um metabolito do glutatão e do NO (Hart, 1985), formado durante a oxidação do NO na presença do glutatão, numa reacção dependente de oxigénio (Hogg *et al.*, 1996), podendo ainda ser formado através da oxidação do glutatão pelos peroxinitritos (van de Vliet *et al.*, 1998).

O GSNO é um agente nitrificante eficiente, relacionado com a função das proteínas no estado saudável e em diversas patologias (Foster *et al.*, 2009). Em circulação sanguínea, o GSNO desempenha um papel fundamental na regulação da homeostasia vascular e está relacionado com a inibição da activação de plaquetas, activação da guanilato ciclase e redução de eventos inflamatórios no endotélio e em linfócitos-T (Liu *et al.*, 2004).

Diversos estudos em animais têm demonstrado a importância do GSNO. Em termos farmacológicos, o GSNO protege o sistema nervoso central da excitotoxicidade, inflamação e espécies reactivas de oxigénio, em diversas situações (Lipton *et al.*, 2001; Chiueh 2002). Khan e colaboradores (2011) demonstraram que o GSNO reduz a concentração de peroxinitritos, que participam na patologia do traumatismo cranioencefálico, além de proteger a integridade da unidade neurovascular do cérebro, indicando que os efeitos deletérios dos peroxinitritos são diminuídos. Além da inibição de plaquetas e activação da guanilato ciclase, o GSNO parece ter um efeito protector na lesão por reperfusão cardíaca e durante a exposição das células a oxidantes (Konorev *et al.*, 1996). Foi ainda demonstrado que o GSNO poderá prevenir a malária cerebral (Zanini *et al.*, 2012) e que desempenha um duplo papel na apoptose celular, sendo protector ou tóxico, consoante a concentração e o tipo de célula (Sandau e Brüne, 1996).

1.5 Acetilcolina e Acetilcolinesterase

Tipicamente, a ACh é considerada um neurotransmissor sintetizado nas células nervosas a partir da colina e da acetil coenzima A, através de um processo mediado

pela colina acetiltransferase, e armazenada em vesículas nos neurónios pré-sinápticos. Com a chegada de um impulso eléctrico, ocorre a libertação da ACh, que se liga ao receptor colinérgico na membrana e desencadeia uma cadeia de reacções interrompida pela AChE, que hidrolisa a ACh em ácido acético e colina (Michelson e Zeimal, 1973). Estudos posteriores confirmaram a presença de ACh em circulação sanguínea, bem como de AChE e receptores de ACh nas membranas dos eritrócitos, células endoteliais e linfócitos, e vieram a reconhecer a sua importância em diversas funções do metabolismo humano (Kawashima *et al.*, 1998; Kirkpatrick *et al.*, 2001; Tang, 1986).

Nas últimas décadas tem sido reconhecido que a AChE e diversos componentes do sistema colinérgico neuronal não são apenas expressos pelas células neuronais mas, por outros tipos de célula, em diversos organismos. Estes estudos conduziram à introdução do conceito de “ACh não neuronal” e do “sistema colinérgico não neuronal” (Wessler *et al.*, 1999). As funções da AChE eritrocitária têm sido estudadas, sendo a principal de hidrolisar o substrato ACh. As maiores concentrações deste enzima verificam-se nos eritrócitos, que apresentam cinética de inibição por excesso de substrato (Wright e Plummer, 1973; Saldanha, 1985; Massoulié *et al.*, 1993).

A ACh estimula a NOS aumentando a produção de NO nas células endoteliais, um efeito mediado pela sua interacção com os receptores muscarínicos M1 e M3, que resulta no relaxamento muscular e vasodilatação, dependentes da integridade do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980). Mesquita e colaboradores (2001) demonstraram a importância da ACh nas propriedades hemorreológicas e no transporte de oxigénio, tendo verificado que a sua presença aumentava a deformabilidade eritrocitária e diminuía a agregação eritrocitária.

A AChE pode ser diferenciada a partir de outras colinesterases como a butirilcolinesterase, com base na afinidade de substrato, afinidade para inibidores selectivos e inibição por excesso de substrato (Massoulié *et al.*, 1993). Estruturalmente, este enzima é composto por um núcleo globular, com o centro activo na parte inferior. Neste núcleo estão incluídos um local periférico aniónico e um local de ligação secundário. Pode ser inibido selectivamente pelos inibidores BW 284c51 e eserina (Grisaru *et al.*, 1999).

Conforme referido anteriormente, a expressão e actividade da AChE não estão limitadas ao sistema colinérgico, pelo que a sua acção tem sido estudada em diversas células, como as epiteliais, mesoteliais, leucócitos e eritrócitos (Carvalho *et al.*, 2005; Grisaru *et al.*, 1999). Consequentemente, foi verificado que diferentes tipos de células expressam diferentes tipos de AChE, devido ao *splicing* alternativo de mRNA que ocorre nas células (Wessler *et al.*, 1999; Grisaru *et al.*, 1999). São assim três as formas

membrana eritrocitária, que provoca a fosforilação da banda 3, originando um maior efluxo de NO (Carvalho *et al.*, 2009).

1.6 Timolol

O timolol é um antagonista dos receptores β -adrenérgicos, utilizado como medicamento tópico para controlo da elevada pressão intraocular em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto (Zimmerman e Kaufman, 1977; Radius *et al.*, 1978).

Conforme referido anteriormente, o NO gerado pelos três enzimas (NOS) parece desempenhar um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, e tem sido identificado em diferentes locais do organismo humano, incluindo a região ocular (Yamamoto *et al.*, 1993). A imunoreactividade para a NOS neuronal tem sido identificada na vasculatura do disco óptico e considerada como promotor do fluxo sanguíneo e vasodilatação em diversas espécies (Koss, 1999). O NO está implicado em diversas patologias oculares, que incluem glaucoma, diabetes, uveíte ou isquemia retinal (Koss, 1999).

Uma desregulação na perfusão do disco óptico com fornecimento sanguíneo reduzido é verificada no caso do glaucoma primário de ângulo aberto, com sobre-expressão das isoformas de NOS neuronal e endotelial (Neufeld *et al.*, 1997; Flammer *et al.*, 1998). Nesta patologia foi demonstrada a existência de alterações locais do sistema L-arginina/NO (Polak *et al.*, 2007).

Nas células musculares lisas, o mecanismo de tradução de sinal do NO é mediado pela activação da guanilato ciclase, dando origem à guanosina monofosfato cíclica, que actua como inibidor da quinase da cadeia leve da miosina, e como activador da fosfatase da mesma cadeia, o que resulta numa desfosforilação e relaxamento muscular (Ignarro *et al.*, 2002). Galassi e colaboradores (2004) observaram níveis reduzidos de guanosina monofosfato cíclica e de nitritos no plasma e no humor aquoso de pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto. Em pacientes com esta patologia, os eritrócitos apresentam uma maior actividade do enzima AChE, quando comparados com pessoas saudáveis, tendo sido demonstrado que o aumento da actividade deste enzima não resulta do efeito terapêutico do timolol, dado que este é um inibidor de AChE (Zabala *et al.*, 1999).

2. Objectivos

Conforme referido anteriormente, o NO está relacionado com patologias oculares como o glaucoma, sendo o timolol utilizado no controlo da pressão intraocular em pacientes com esta patologia. (Zimmerman e Kaufman, 1977; Radius *et al.*, 1978; (Koss, 1999). Nos eritrócitos de pacientes com glaucoma, a maior actividade da AChE não é resultante do efeito terapêutico do timolol, uma vez que este é um inibidor da AChE. (Zabala *et al.*, 1999).

Assim sendo, o presente estudo tem como objectivo avaliar o efeito do timolol na mobilização interna do NO eritrocitário, em condições fisiológicas normais. Para atingir este objetivo estudou-se o efeito *in vitro* de moduladores da AChE – ACh e timolol – no NO e nos seus metabolitos – GSNO, SNO-Hb e peroxinitritos.

Para além do objectivo acima descrito, pretendeu-se igualmente averiguar se ocorre efluxo de GSNO concomitante com a saída de NO do eritrócito, após estimulação *in vitro* com efectores da AChE – ACh e timolol.

3. Material

3.1 Equipamentos e material

- Amino-IV sensors; Innovative instruments, EUA;
- Arcas frigoríficas -4°C, -20°C e -80°C;
- Banho de água termostatzado a 37°C;
- Centrífuga 2233 M-2, HERMLE, Alemanha;
- Centrífuga Sorvall (Wilmington, DE) TC6;
- Centrífuga ALC 4223 MK2;
- Copos de laboratório Normax;
- Cuvetes;
- Espectrofotómetro F-3000, Hitachi, Japão;
- Espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys, Thermo Electron Corporation, EUA;
- Luvas;
- Micro tubos Eppendorf;
- Microplate Reader TECAN Infinity F500;
- Nitric Oxide Measuring System, Innovative Instruments, EUA; (confirmer)
- Pipetas Gilson 2,5,10,20,100,200,1000 µL;
- Pontas de pipeta;
- Tubos de colheita de sangue;
- Vórtex;

3.2 Reagentes

- 4,5-diaminofluoreceína (DAF-2), SIGMA;
- 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), SIGMA;
- Acetilcolina iodeto, SIGMA;
- Acetilcolina cloreto, SIGMA;
- Clorofórmio, Merck;
- Dimetilsufóxido (DMSO), SIGMA;
- Etanol 95%, Merck;
- HgCl₂, SIGMA;
- Kit Reagente de Griess, Molecular Probes;
- NaCl isotónico 0,9% em pH 7,4%, AnalaR, BDH Laboratory;
- Timolol (2,5%)

4. Modelo Experimental

4.1 Protocolo de colheita de sangue

O sangue utilizado nos ensaios (9 ml) foi colhido por punção venosa no antebraço de dadores saudáveis (n=18) após consentimento informado, no Instituto Português do Sangue (Lisboa, Portugal), no âmbito de um acordo institucional com o Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. O sangue foi recolhido para tubos de colheita com anticoagulante heparina 10 UI/ml (1,5 mg/ml), sendo os procedimentos laboratoriais iniciados num período máximo de 60 minutos após a colheita.

Apenas foram incluídos no presente estudo indivíduos do sexo masculino com idades compreendidas entre os 18 e 60 anos. A exclusão de mulheres pretendeu evitar alterações hormonais resultantes do ciclo menstrual.

De modo a excluir variações circadianas, a colheita de sangue foi realizada sempre no período da manhã, tendo o sangue sido analisado nos laboratórios da Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação, do Instituto de Medicina Molecular (IMM), Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

4.2 Preparação da Suspensão de Eritrócitos

O sangue total heparinizado foi centrifugado a 1,0409 g durante 10 minutos numa centrífuga Sorvall (Wilmington, DE) TC6, após o que se descartou o plasma e a camada leuco-plaquetária. A suspensão de eritrócitos foi feita com a adição de NaCl isotónico (0,9% em pH 7,4, AnalaR, BDH Laboratory) de modo a reconstituir o hematócrito inicial.

4.3 Modelo Experimental

De modo a atingir os objectivos deste estudo, cada suspensão de eritrócitos (correspondente a cada uma das amostras de sangue) foi dividida em amostras de 1

mL e centrifugada durante 1 minuto a 11000 rpm numa centrífuga Biofuge 15 (Heraeus, Sepatech), sendo em seguida preparadas do seguinte modo:

- Alíquota Controlo – não se adicionou qualquer efector;
- Alíquota ACh – foram retirados 10 microlitros do sobrenadante e adicionados 10 microlitros de ACh 10^{-3} M como controlo positivo;
- Alíquota Timolol – foram retirados 10 microlitros do sobrenadante e adicionados 10 microlitros de timolol 10^{-3} M.

As alíquotas foram incubadas no escuro durante trinta minutos, a 37°C e com agitação ligeira, sendo em seguida centrifugadas (11000 rpm durante 1 minuto). Primeiro, foi determinado o GSNO no sobrenadante, sendo o restante descartado e os eritrócitos utilizados para determinação de NO, GSNO, SNO-Hb e Peroxinitritos.

5. Procedimento Experimental

5.1 Determinação da Concentração do NO Eritrocitário

In vitro, os eritrócitos geram valores amperométricos significativos de NO, em resposta a uma vasta gama de efectores, pelo que o recurso a um sensor amperométrico de NO constitui um método fiável para a medição directa em tempo real do efluxo de NO nas suspensões de eritrócitos. Assim, para quantificação amperométrica do NO foi seguido um método descrito por Carvalho e colaboradores (2004a), utilizando o sensor amino-IV (Innovative Instruments, Tampa, FL). Segundo os autores, o NO difunde-se através da membrana *tripleCOAT* do sensor permeável a gases e é depois oxidado no eléctrodo de platina, resultando em corrente eléctrica. A corrente redox é proporcional à concentração de NO fora da membrana e é monitorizada continuamente com os sensores, ligados a um computador. Para cada experiência, o sensor de NO foi imerso na vertical na suspensão de eritrócitos e estabilizado durante cerca de 30 minutos para permitir atingir os níveis basais de NO.

Após incubação com os efectores em estudo, a suspensão de eritrócitos foi centrifugada, sendo adicionado NaCl (0,9% pH 7.0) de modo a atingir um hematócrito de 0,05%. A suspensão foi em seguida homogeneizada através de uma inversão suave, e depois adicionada ACh (ACh, 30 µl; Sigma, St. Louis, MO) às alíquotas de suspensão de eritrócitos, de modo a atingir uma concentração final de 10 µM, tendo sido registadas as alterações na corrente eléctrica. Estas alterações de correntes são proporcionais à quantidade de NO mobilizado pelos eritrócitos estimulados pela ACh e, com base numa curva de calibração calculada previamente utilizando concentrações conhecidas de NO, permite determinar a concentração de NO da suspensão (Almeida *et al*, 2009).

Os dados foram registados à temperatura ambiente, com agitação suave constante.

5.2 Determinação da SNO-Hb

De acordo com Sonveaux *et al* (2005), a determinação da concentração de SNO-Hb é baseada na reacção de clivagem dos s-nitrosotióis que produzem um nitrosante que ativa 4,5- diaminofluoreceína (DAF-2).

Após o período de incubação, conforme descrito anteriormente, as suspensões de eritrócitos foram centrifugadas a 9600 *g* durante 1 minuto, numa centrífuga Heraeus Biofuge e o sobrenadante descartado. Um volume de 400 µL de H₂O (pH 7.0) foi adicionado a 400 µL de eritrócitos, para uma diluição final de 1/200 com NaCl 0.9%. Esta solução foi misturada com 5 mM de DAF-2 (30 µmol/L concentração final), reagindo durante 10 minutos com um volume equivalente de HgCl₂ (1.2 mmol/L), provocando a clivagem de SNO-Hb. A reacção termina com a adição de uma mistura de clorofórmio e etanol

Finalmente, a fluorescência das amostras foi determinada num espectrofotómetro Microplate Reader TECAN Infinity F500 com a excitação de luz a 485 nm e emissão a 520 nm, sendo os resultados da concentração de SNO-Hb quantificados com base na diferença de sinais de fluorescência gerada na presença e ausência de HgCl₂ (Sonveaux *et al*, 2005).

5.3 Determinação de GSNO intra e extra celular.

O método de determinação de GSNO descrito, segundo Guevara *et al* (1998), baseia-se na medição da fluorescência emitida pelo GSNO com o reagente de Griess no espectrofotómetro.

Após incubação, as suspensões de eritrócitos foram centrifugadas durante 1 minuto a 9600 *g*, numa centrífuga Heraeus Biofuge, sendo o sobrenadante e os eritrócitos separados, e o primeiro armazenado para determinação do GSNO.

Para determinar a concentração de GSNO intra-eritrocitário procedeu-se à hemólise da suspensão de eritrócitos com adição de água MILLI-Q, e precipitação da hemoglobina com etanol e clorofórmio. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada no vortex e centrifugada durante 2 minutos a 3000 rpm numa centrífuga 2233 M-2, (Hermle, Alemanha), sendo o sobrenadante armazenado para determinação de GSNO (Carvalho *et al*, 2004).

Para a quantificação de GSNO foi preparada uma mistura de reacção contendo 57,7 mM de ácido sulfanílico (componente B do reagente de Griess) e 7,5 mM de Nedd (componente A do reagente de Griess), dissolvidos num tampão fosfato pH 7.4 (PBS). Uma solução HgCl₂ (Aldrich) 10 mM foi preparada em 0.136g/50mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Aldrich).

Foram depois adicionados aos dois sobrenadantes – intra (200 µL) e extra eritrocitário (300 µL) - a mistura de reação, na presença e na ausência da solução de HgCl₂ em dimetilsulfóxido, de modo a perfazer uma concentração de 100 mM. As soluções foram suavemente agitadas por inversão e deixadas no escuro durante 20 minutos, sendo a concentração de GSNO determinada no espectrofotômetro a 490 nm (Spectronic 20 Genesys).

A concentração de GSNO foi calculada através de extrapolação dos resultados obtidos com um acurva de calibração (1-100 mM) de nitrito de sódio em água desionizada e por um espectro de controlo da solução com mercúrio iónico (Cook *et al*, 1996).

5.4 Determinação de Peroxinitritos

As suspensões de eritrócitos foram incubadas com 15 µL de DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate 15 mM) e 3 mL de tampão fosfato (Pi 155 mM, pH 7.4) durante 30 minutos à temperatura ambiente, sendo as soluções invertidas diversas vezes e depois diluídas em 1.8 mL do mesmo tampão.

A fluorescência das amostras foi em seguida medida num espectrofotômetro Microplate Reader TECAN Infinity F500 com a excitação de luz a 503 nm e emissão a 523 nm.

O 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) propaga-se através da membrana celular, sendo posteriormente desacetilado pelas esterases intracelulares, originando o DCF-H - composto não fluorescente, que por sua vez é convertido pelos peroxinitritos num composto altamente fluorescente – o DCF. A concentração de peroxinitritos na suspensão foi determinada com base numa curva de calibração (1-100 µM) calculada previamente utilizando concentrações conhecidas de peroxinitritos. (Possel *et al*, 1997).

5.5 Análise Estatística

Na análise estatística dos dados foram utilizados os programas informáticos EXCEL, SPSS (versão 20.0) e GraphPad Prism (versão 5.0) sendo os dados resumidos como valores da mediana.

As diferenças nos parâmetros de metabolismo de NO eritrocitário foram avaliadas para cada um dos ensaios (papel da ACh e do timolol sobre o metabolismo do NO nos eritrócitos) utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney.

6. Resultados

As concentrações de ACh e timolol foram escolhidas com base em estudos anteriores de Carvalho e colaboradores (2004 a, b) e Niday e colaboradores (1980). O valor de concentração da ACh de 10 μ M é inferior ao valor de Km da AChE e, portanto, muito diferente do valor de excesso de substrato que inibe este enzima. (Saldanha, 1985). Os resultados obtidos são representados pelos valores da mediana, sendo apresentados os valores médios e percentis nos anexos I e II, respectivamente.

6.1 Determinação da Concentração de NO Eritrocitário

Na figura 3 são apresentados os valores da mediana para a determinação de NO (nM) obtidos no ensaio de controle, ACh 10⁻⁵ M e timolol 10⁻⁵ M.

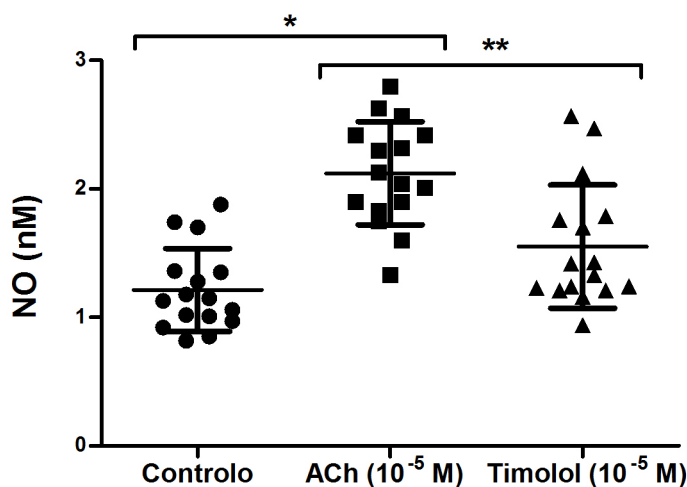


Figura 3. Valores das concentrações de NO (nM) nos ensaios de controle, ACh (10⁻⁵ M) e timolol (10⁻⁵ M). * P < 0,05 versus controle; ** P < 0,05 versus ACh.

Como se pode verificar pela observação da figura, a presença de timolol não provocou alterações significativas na concentração de NO relativamente à alíquota de controle, sendo no entanto verificado uma diminuição desta concentração por comparação à alíquota de ACh (1,38 nM; $P < 0.05$); a qual apresenta concentrações de NO superiores (2,09 nM) à alíquota de controle (1,14 nM; $P < 0.05$).

Assim sendo, o presente estudo não evidenciou variação no efluxo de NO na presença de timolol por comparação à sua ausência, mas valores inferiores quando comparados às suspensões de eritrócitos com ACh.

6.2 Determinação da Concentração de SNO-Hb

Na figura 4 são apresentados os valores da mediana para a determinação de SNO-Hb obtidos no ensaio de controle, ACh 10^{-5} M e timolol 10^{-5} M.

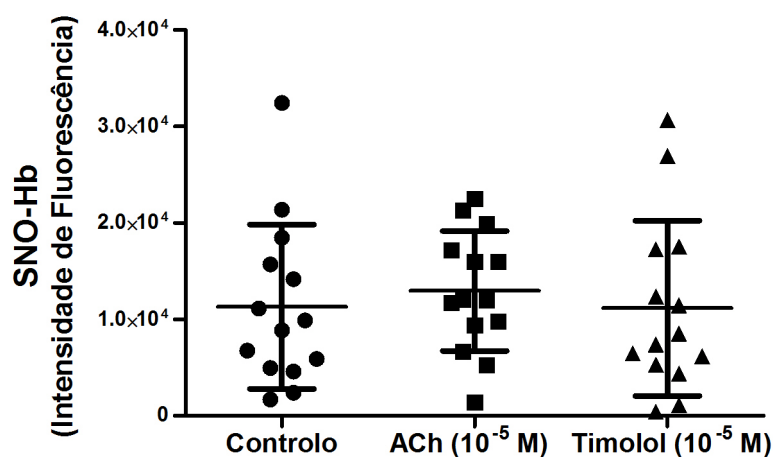
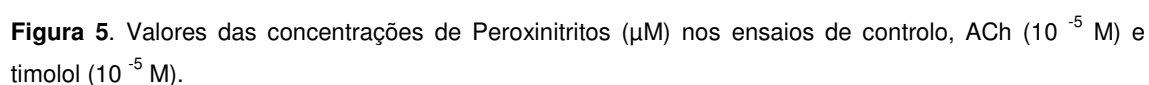


Figura 4. Valores de SNO-Hb (intensidade de fluorescência) para ensaios de controle, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).

Tanto a presença de timolol como de ACh não evidenciaram alterações relativamente ao ensaio de controle.

6.3 Determinação da Concentração de Peroxinitritos

Na determinação de peroxinitritos (μ M), os valores da mediana obtidos nos ensaios de controle, ACh 10^{-5} M e timolol 10^{-5} M, são apresentados na figura 5.



6.4 Determinação da Concentração de GSNO eritrocitário

Scatter plot showing intracellular GSNO levels (µM) for Control, ACh (10⁻⁵ M), and Timolol (10⁻⁵ M) groups. The y-axis ranges from 0 to 15 µM. Control (black circles) has a mean of ~6.5 µM. ACh (red squares) has a mean of ~8.5 µM. Timolol (green triangles) has a mean of ~2.0 µM. Statistical significance is indicated by asterisks: * for Control vs ACh, * for Control vs Timolol, and ** for ACh vs Timolol.

Figura 6. Valores das concentrações de GSNO eritrocitário (μM) nos ensaios de controle, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M). * $P < 0,05$ versus controle; ** $P < 0,05$ versus ACh.

A presença de timolol teve efeitos na diminuição da concentração de GSNO (1,11 μM) por comparação com a alíquota de controle (6,67 μM ; $P < 0.05$) e com a alíquota de ACh (7,78 μM ; $P < 0.05$). Verificou-se um aumento estatisticamente significativo nesta concentração, na presença de ACh em relação ao controle.

6.5 Determinação da Concentração de GSNO - efluxo

Os valores da mediana obtidos na determinação do efluxo de GSNO (μM), nos ensaios de controle, ACh 10^{-5} M e timolol 10^{-5} M, são apresentados na figura 7.

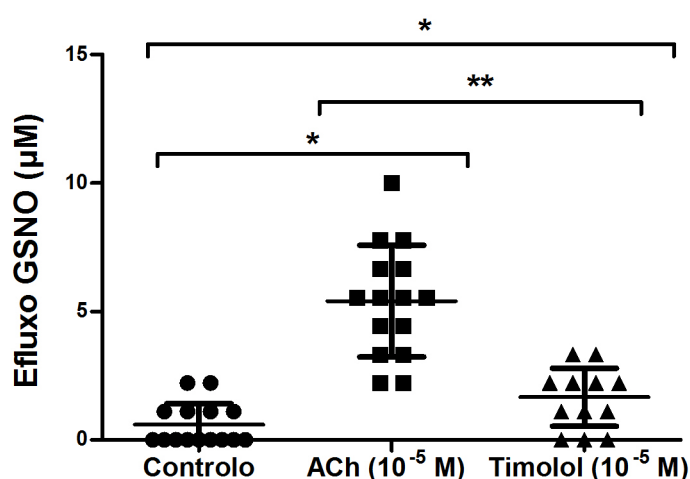


Figura 7. Valores das concentrações de GSNO - efluxo (μM) nos ensaios de controle, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M). * $P < 0,05$ versus controle; ** $P < 0,05$ versus ACh.

O valor da mediana para o efluxo de GSNO na presença de timolol é menor (2,22 μM), e com significância estatística, quando comparado com a alíquota de ACh (5,56 μM ; $P < 0.05$) e com a alíquota de controle (0,00 μM ; $P < 0.05$).

Na presença de ACh verificou-se um aumento do efluxo de GSNO relativamente à alíquota de controle ($P < 0.05$).

6.6 Determinação da Concentração de GSNO eritrocitário + efluxo

Na figura 8 são apresentados os valores da mediana para a determinação de GSNO eritrocitário e efluxo de GSNO (μM) obtidos no ensaio de controle, ACh 10^{-5} M e timolol 10^{-5} M.

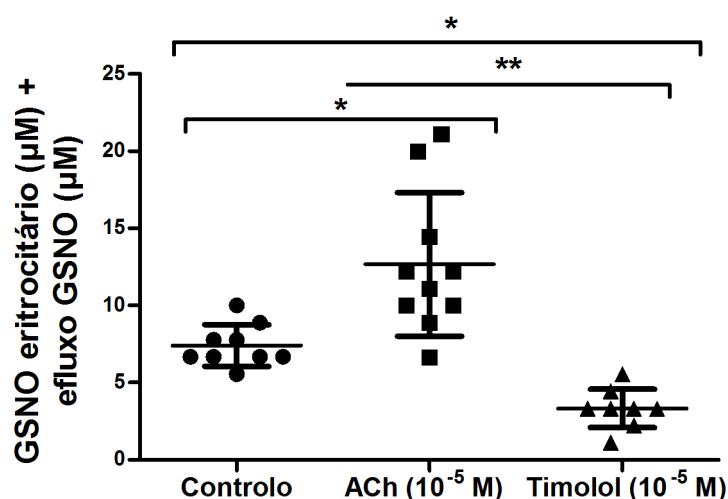


Figura 8. Valores das concentrações de GSNO eritrocitário (μM) + efluxo (μM) nos ensaios de controle, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M). * $P < 0,05$ versus controle; ** $P < 0,05$ versus ACh.

A alíquota de timolol apresenta valores menores ($3,33 \mu\text{M}$), estatisticamente significativos, quando comparados com as alíquotas de controle ($6,67 \mu\text{M}$ $P < 0,05$) e de ACh ($11,67 \mu\text{M}$; $P < 0,05$).

Por sua vez, a presença de ACh provocou um aumento estatisticamente significativo no valor da mediana de GSNO eritrocitário + efluxo quando comparado com a alíquota de controle ($P < 0,05$).

6.6 Correlação entre efluxo de GSNO e NO.

Na figura 8 é apresentada a correlação entre o valores de GSNO obtidos e os de NO, para os ensaios de controle, ACh 10^{-5} M e timolol 10^{-5} M.

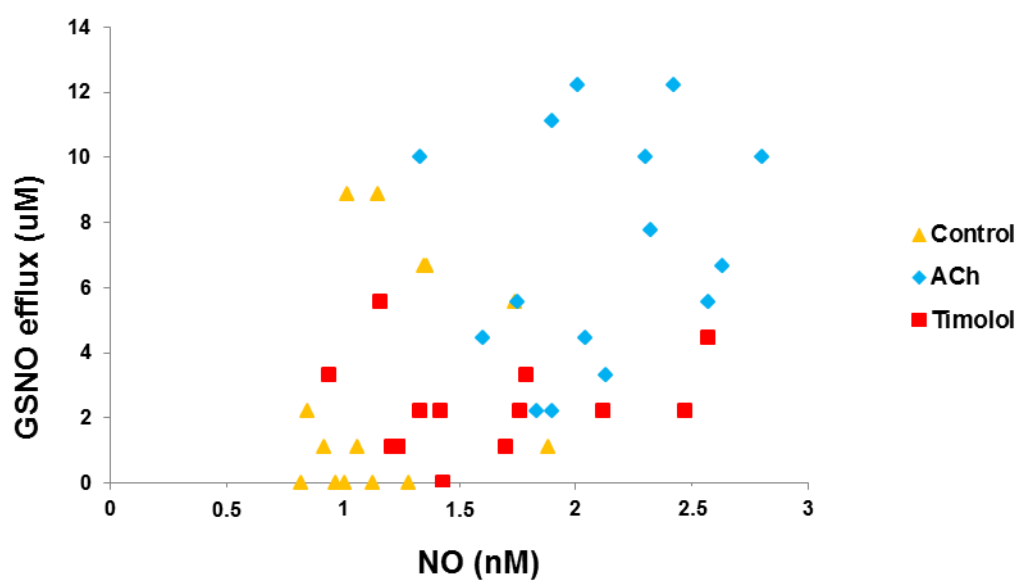


Figura 9. Correlação entre valores das concentrações de efluxo de GSNO (μM) e NO (nM) para ensaios de controle, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).

A correlação obtida entre os valores de NO (nM) e o efluxo de GSNO (μM) foi de $r=0,512$, existindo assim uma correlação significativa entre estas concentrações.

7. Discussão

De modo a garantir a sua biodisponibilidade, o NO, instável e altamente reactivo, pode originar diversos metabolitos mais estáveis (Archer, 1993). No eritrócito, os principais metabolitos do NO são a SNO-Hb – originada pela ligação do NO à hemoglobina através da cadeia β da cisteína) (Gross e Lane, 1999); os peroxinitritos – resultado da ligação do NO ao anião superóxido decorrente da auto oxidação da hemoglobina, que, por sua vez, podem produzir nitratos ou causar danos em proteínas, lípidos e hidratos de carbono através de reacções de oxidação e nitrificação (Pryor e Squadrito, 1995); o GSNO - produzido na reacção entre o NO e o glutatião (Singh *et al.*, 1996); e os nitratos – resultantes da ligação do NO à oxihemoglobina, podendo depois ser convertidos em nitritos pela metahemoglobina reductase (Gibson e Roughton, 1957).

7.1 Avaliação do efeito do timolol no metabolismo do NO eritrocitário.

Os resultados obtidos não demonstram variação no efluxo de NO eritrocitário na presença de timolol, por comparação à sua ausência. No entanto, estes resultados são inferiores aos obtidos nas suspensões de eritrócitos contendo ACh. Sendo o timolol um inibidor de AChE (Zabala *et al.*, 1999), este resultado é concordante com o obtido para a velnacrina, um inibidor da AChE (Carvalho *et al.*, 2008). A menor disponibilidade do eritrócito para libertar NO induzida pelo timolol pode resultar, se também verificado *in vivo*, num mecanismo local compensatório na vasculatura, quando se verificar produção elevada de NO. Tal mecanismo pode ser útil na vasculatura do disco óptico em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto, com sobreexpressão de NOS neuronal e endotelial (Neufeld *et al.*, 1997; Flammer e Orgul, 1998). O aumento do efluxo de NO verificado na presença de ACh é concordante com estudos anteriores (Carvalho *et al.*, 2004a,b; Almeida *et al.*, 2009), podendo ser explicado pelas alterações conformacionais na associação da proteína banda 3 com a proteína G nas subunidades G α 1/G α 2 e G β , resultantes da formação do complexo AChE-substrato pela adição de ACh. Com estas alterações ocorre um aumento na actividade das proteínas tirosina cinase na membrana eritrocitária, que resultam na fosforilação da proteína banda 3 e, consequentemente, num maior efluxo de NO e numa maior concentração eritrocitária de metabolitos do NO (Carvalho *et al.*, 2009).

Não foram verificadas variações significativas nas concentrações de peroxinitritos com qualquer um dos efectores utilizados - ACh e timolol - o que poderá ser explicado pela rápida conversão dos peroxinitritos, citotóxicos para as células em concentrações elevadas, em nitratos (Pryor e Squadrito, 1995). A biodisponibilidade do NO fica assegurada com esta transformação.

As moléculas de SNO-Hb podem transferir NO para o glutatião com formação de nitrato e GSNO, ou libertá-lo quando ocorre auto oxidação de hemoglobina, com formação de peroxinitritos (Balagopalakrishna *et al.*, 1996; McMahon *et al.*, 2000).

Para os valores de SNO-Hb não foram identificadas diferenças significativas entre o ensaio de controlo e os de timolol e ACh. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Pawloski e Stamler, 2002; Lopes de Almeida *et al.*, 2009) confirmando que, sendo as moléculas de SNO-Hb os principais reservatórios de NO nos eritrócitos, os seus níveis se mantêm praticamente inalterados. Estas moléculas mantêm a biodisponibilidade de NO e têm capacidade de transferir NO para moléculas de baixo peso molecular com o grupo tiol presente (Gross, 2001). Uma vez que os s-nitrosotióis não reagem com o composto Fe(II)-Hb, os mesmos possibilitam um meio de transferência de equivalentes de NO do eritrócito para moléculas alvo responsáveis pelo relaxamento vascular (Lopes de Almeida *et al.*, 2009).

As concentrações de GSNO eritrocitário inferiores, verificadas na suspensão de eritrócitos incubada com timolol, relativamente às suspensões incubadas com ACh e à de controlo não são concordantes com os resultados obtidos com velnacrina (Lopes de Almeida *et al.*, 2009). Esta concentração inferior de GSNO sugere que este foi consumido na reacção irreversível com a desoxihemoglobina para formar glutatião, metahemoglobina e NO (Spencer *et al.*, 2000). Por sua vez, o NO reduz a oxihemoglobina para dar origem a nitratos e metahemoglobina. A baixa concentração de GSNO é benéfica pois não inibe a hemoglobina reductase, responsável por normalizar os níveis de metahemoglobina (Becker *et al.*, 1995).

O timolol induz uma menor inibição da AChE, originando um complexo inactivo menos forte, quando comparado com a velnacrina. A diferença neste estado de inactivação do enzima pode explicar as variações das concentrações de derivados do NO na presença de timolol e velnacrina. No entanto, ambos os inibidores induzem mobilização do NO no eritrócito (Zabala *et al.*, 1999; Saldanha *et al.*, 2013). A inibição da AChE pelo timolol pode resultar da ligação deste ao centro activo ou periférico, ou da ligação ao receptor β -adrenérgico que por outro mecanismo inibe a AChE.

Os resultados obtidos demonstram que a presença de timolol, por comparação com a sua ausência, mantém os níveis de NO no eritrócito, preservando o seu efluxo e favorecendo a sua mobilização interna. Esta mobilização altera os níveis de GSNO,

não favorecendo no entanto a formação de peroxinitritos. Estes resultados reforçam o mecanismo de tradução de sinal descrito para o NO, na dependência do grau desactivação ou inactivação dos complexos de AChE, sendo expectável a mesma função na microcirculação ocular, quando aplicado como composto terapêutico (Saldanha *et al.*, 2013).

7.2 Avaliação do efluxo de GSNO eritrocitário

Os s-nitrosotióis foram observados em condições basais (Stamler *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2004), em sistemas biológicos, desde animais a células e foi verificado o aumento da sua concentração em resposta a estímulos inflamatórios (Jourdain *et al.*, 2000; Crawford *et al.*, 2004). Segundo Gordge e colaboradores (1998), as próprias células podem desempenhar uma importante função no metabolismo dos s-nitrosotióis. A exposição das células a s-nitrosotióis depende não só da natureza dos s-nitrosotióis mas também da composição do meio a que as células estão expostas (Zhang e Hogg, 2005).

Os processos de formação dos s-nitrosotióis não são ainda totalmente conhecidos e existem lacunas na justificação da relação entre a biologia química dos s-nitrosotióis e as suas funções conhecidas (Broniowska *et al.*, 2012).

Para a formação de GSNO sob condições aeróbias, é necessária a oxidação do NO pelo oxigénio, ocorrendo a nitroação através da formação de trióxido de dinitrogénio (N_2O_3) ou pela adição de NO a um radical *glutathionyl* formado durante a reacção (Broniowska *et al.*, 2013). A maioria dos estudos parece sugerir que a nitroação não é o principal destino do NO e que apenas uma quantidade muito pequena de NO gerado é convertido em GSNO num sistema biológico (Broniowska *et al.*, 2013). Ambiente hidrofóbicos como os das membranas celulares são locais importantes de formação de s-nitrosotióis (Liu *et al.*, 1998).

Apesar de já ter sido determinada a concentração de GSNO no plasma (Tsikas *et al.*, 2013), os resultados obtidos demonstram pela primeira vez que existe efluxo de GSNO concomitante com a saída de NO nas suspensões de eritrócitos estimuladas com ACh e com timolol, resultados que são reforçados pela existência de uma correlação significativa entre o efluxo de GSNO e de NO dos eritrócitos. Verificou-se ainda que, nas suspensões de eritrócitos estimuladas com timolol, o efluxo é significativamente inferior quando comparado com a suspensão contendo ACh, o que poderá estar relacionado com a indução da inibição da AChE.

Os mecanismos que permitem a libertação de NO a partir dos s-nitrosotióis não são ainda totalmente conhecidos - os s-nitrosotióis não libertam NO espontaneamente apesar de, em certas condições, estes se possam decompor ou ser metabolizados para formar NO (Hogg, 2002). Vários estudos têm incidido sobre os efeitos biológicos do GSNO através da sua adição a células, assumindo que o GSNO “liberta” NO. Apesar de tal poder acontecer em culturas, a taxa de formação de NO é determinada por condições externas e não pode ser o principal mecanismo de decomposição do GSNO (Broniowska *et al.*, 2013).

Diversos estudos documentam a correlação de níveis de s-nitrosotióis e patologias em humanos. Calabrese e colaboradores (2002) demonstram a correlação de níveis de s-nitrosotióis e a esclerose múltipla, sendo quantificados níveis mais elevados de s-nitrosotióis no líquido cefalorraquidiano de pessoas com esta patologia. Corradi e colaboradores (2001), demonstraram que é possível quantificar a presença de s-nitrosotióis no ar expelido e que esta concentração é superior, por comparação aos grupos de controlo, em pacientes com asma, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crónica. Brown e colaboradores (2002), demonstraram que o NO influencia diversos processos que ocorrem na mitocôndria, em particular na cadeia respiratória, com consequências nas funções da célula, incluindo na apoptose. Concentrações nanomolares de NO inibem de modo reversível o citocromo oxidase, em competição com o oxigénio, enquanto concentrações mais elevadas de NO e dos seus metabolitos, onde se inclui o GSNO, podem causar inibição irreversível da cadeia respiratória.

Segundo Broniowska e colaboradores (2013), foram conduzidos, até à data, cerca de 20 ensaios clínicos sobre a eficácia terapêutica do GSNO. A maioria incide sobre o seu efeito em doenças cardiovasculares (Broniowska *et al.* 2013), enquanto outros sugerem que tratamentos com GSNO poderão ser benéficos na melhoria do declínio cognitivo associado à doença de Alzheimer (Won *et al.*, 2013). O efeito mais conhecido do GSNO no organismo humano é o da sua acção nas plaquetas, onde se pensa que actue como como dador de NO (Langford *et al.*, 1994; Salas *et al.*, 1998; Kaposzta *et al.*, 2002), tendo efeitos benéficos. O GSNO está também relacionado com modulação da glicólise nos eritrócitos, onde influencia a translocação do enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase da membrana para o citoplasma (Galli *et al.*, 2002). Palmer e colaboradores (2007) demonstraram, em animais, que a administração oral de GSNO não causa hipertensão pulmonar arterial, apesar do GSNO ter um efeito de agente mimetizante de hipoxia *in vitro* (Lipton *et al.*, 2001).

Se o GSNO está implicado em diversas terapêuticas, a sua libertação concomitante com a do NO pode ser benéfica na vasculatura.

8. Considerações Finais

Actualmente estão identificadas diversas potenciais fontes de bioactividade do NO no sangue, mantendo-se no entanto questões relacionadas com estas fontes, nomeadamente sobre os mecanismos de actuação em células alvo do NO libertado.

A redução da biodisponibilidade de NO origina uma situação de disfunção endotelial, que por sua vez desencadeia alterações nas paredes dos vasos. Estas alterações relevantes são precursoras da formação da placa aterosclerótica (Madamanchi e Runge, 2013) e podem ser relacionadas com a doença coronária (Kinlay *et al.*, 2001). O presente estudo permitiu um conhecimento mais aprofundado sobre as vias do metabolismo do NO eritrocitário podendo ser útil para uma detecção precoce da disfunção endotelial, factor de risco das doenças cardiovasculares. Será pertinente dar continuidade aos conclusões obtidas sobre o metabolismo do NO eritrocitário, nomeadamente o efluxo de GSNO em condições agudas de disfunção endotelial e inflamação e o efeito do timolol na mobilização interna de NO em indivíduos com glaucoma.

9. Referências Bibliográficas

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001 Aug 1; 357(Pt 3):593-615.
- An XL, Takakuwa Y, Nunomura W, Manno S, Mohandas N. Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties. *J Biol Chem*. 1996 Dec 27; 271(52):33187-91.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al*. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. Renewal by Multipotent Stem Cells: Blood Cell Formation.
- Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*. 1993 Feb 1; 7(2):349-60.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Aug; 74(8):3203-7.
- Babu N. Influence of hypercholesterolemia on deformability and shape parameters of erythrocytes in hyperglycemic subjects. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009; 41(3):169-77. doi: 10.3233/CH-2009-1165.
- Balagopalakrishna C, Manoharan PT, Abugo OO, Rifkind JM. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. *Biochemistry*. 1996 May 21; 35(20):6393-8.
- Becker K, Gui M, Schirmer RH. Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *Eur J Biochem*. 1995 Dec 1; 234(2):472-8.
- Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 May; 284(5):H1577-84.
- Broniowska KA, Hogg N. The chemical biology of S-nitrosothiols. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Oct 1; 17(7):969-80. doi: 10.1089/ars.2012.4590.
- Broniowska KA, Diers AR, Hogg N. S-nitrosoglutathione. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May; 1830(5):3173-81. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*. 2002 Dec 1; 33(11):1440-50.
- Brunati AM, Bordin L, Clari G, James P, Quadroni M, Baritono E, Pinna LA, Donella-Deana A. Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary and secondary phosphorylation sites. *Blood*. 2000 Aug 15; 96(4):1550-7.
- Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res*. 2005 Apr 29; 96(8):818-22.
- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Foresti R, Bates TE, Giuffrida Stella AM, Pennisi G. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein

nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *J Neurosci Res.* 2002 Nov 15;70(4):580-7.

Carvalho FA, Martins-Silva J, Saldanha C. Amperometric measurements of nitric oxide in erythrocytes. *Biosens Bioelectron.* 2004a Oct 15; 20(3):505-8

Carvalho FA, Mesquita R, Martins-Silva J, Saldanha C. Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. *J Appl Toxicol.* 2004b Nov-Dec; 24(6):419-27.

Carvalho FA, Graça LM, Martins-Silva J, Saldanha C. Biochemical characterization of human umbilical vein endothelial cell membrane bound acetylcholinesterase. *FEBS J.* 2005 Nov; 272(21):5584-94.

Carvalho FA, Almeida JP, Fernandes IO, Freitas-Santos T, Saldanha C. Non-neuronal cholinergic system and signal transduction pathways mediated by band 3 in red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 40(3):207-27.

Carvalho FA, de Almeida JP, Freitas-Santos T, Saldanha C. Modulation of erythrocyte acetylcholinesterase activity and its association with G protein-band 3 interactions. *J Membr Biol.* 2009 Mar;228(2):89-97. doi:10.1007/s00232-009-9162-8.

Cerwinka WH, Cooper D, Kriegstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Mar; 282(3):H1111-7.

Chen K, Popel AS. Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma. *Biorheology.* 2009;46(2):107-19. doi: 10.3233/BIR-2009-0531.

Chiueh CC. S-nitrosoglutathione (GSNO) mediates brain response to hypoxia. *Pediatr Res.* 2002 Apr; 51(4):414.

Cook JA, Kim SY, Teague D, Krishna MC, Pacelli R, Mitchell JB, Vodovotz Y, Nims RW, Christodoulou D, Miles AM, Grisham MB, Wink DA. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal Biochem.* 1996 Jul 1; 238(2):150-8.

Cooper CE, Brown GC. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr.* 2008 Oct; 40(5):533-9. doi: 10.1007/s10863-008-9166-6.

Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Mar;163(4):854-8.

Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Wacławski MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003 Dec; 9(12):1498-505.

Crawford JH, Chacko BK, Pruitt HM, Piknova B, Hogg N, Patel RP. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood.* 2004 Sep 1; 104(5):1375-82.

De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, Tomasoni L, Turiel M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit*. 2009 Apr; 15(4):RA91-101.

Dejam A, Hunter CJ, Tremonti C, Pluta RM, Hon YY, Grimes G, Partovi K, Pelletier MM, Oldfield EH, Cannon RO 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. *Circulation*. 2007 Oct 16; 116(16):1821-31.

Devlin Thomas M. Ed. *Textbook of Biochemistry, with Clinical Correlations*. 2010. Devlin, 7th edition.

Flammer J, Orgül S. Optic nerve blood-flow abnormalities in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 1998 Apr; 17(2):267-89.

Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med*. 2009 Sep;15(9):391-404. doi: 10.1016/j.molmed.2009.06.007.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27; 288(5789):373-6.

Galassi F, Renieri G, Sodi A, Ucci F, Vannozzi L, Masini E. Nitric oxide proxies and ocular perfusion pressure in primary open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 2004 Jun; 88(6):757-60.

Galli F, Rossi R, Di Simplicio P, Floridi A, Canestrari F. Protein thiols and glutathione influence the nitric oxide-dependent regulation of the red blood cell metabolism. *Nitric Oxide*. 2002 Mar; 6(2):186-99.

Gibson WH, Roughton FJ. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *J Physiol*. 1957 May 23; 136(3):507-24.

Go YM, Patel RP, Maland MC, Park H, Beckman JS, Darley-Usmar VM, Jo H. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-JunNH₂-terminal kinase. *Am J Physiol*. 1999 Oct; 277(4 Pt 2):H1647-53.

Gordge MP, Addis P, Noronha-Dutra AA, Hothersall JS. Cell-mediated biotransformation of S-nitrosoglutathione. *Biochem Pharmacol*. 1998 Mar 1; 55(5):657-65.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*. 1999 Sep; 264(3):672-86.

Gross SS, Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 31; 96(18):9967-9.

Gross SS. Vascular biology. Targeted delivery of nitric oxide. *Nature*. 2001 Feb 1; 409(6820):577-8.

Guyton A, Hall J. *Textbook of Medical Physiology*. 2006, Elsevier Saunders, 11th ed.

Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*. 1998 Jun 22; 274(2):177-88.

Hart TW. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Lett*. Volume 26, Issue 16, 1985, Pages 2013–2016.

Hogg N, Singh RJ, Kalyanaraman B. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett*. 1996 Mar 18; 382(3):223-8.

Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002; 42:585-600.

Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest*. 2005 Aug; 115(8):2099-107.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec; 84(24):9265-9.

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*. 2002 Dec; 53(4 Pt 1):503-14.

Jourd'heuil D, Gray L, Grisham MB. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 24; 273(1):22-6.

Kahn MJ, Maley JH, Lasker GF, Kadowitz PJ. Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2013 Mar 1;13(1):83-7.

Kaposzta Z, Clifton A, Molloy J, Martin JF, Markus HS. S-nitrosoglutathione reduces asymptomatic embolization after carotid angioplasty. *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3057-62.

Kawashima K, Fujii T, Watanabe Y, Misawa H. Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes. *Life Sci*. 1998; 62(17-18):1701-5.

Kennedy SP, Warren SL, Forget BG, Morrow JS. Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid beta-spectrin. *J Cell Biol*. 1991 Oct; 115(1):267-77.

Khan M, Sakakima H, Dhammu TS, Shunmugavel A, Im YB, Gilg AG, Singh AK, Singh I. S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats. *J Neuroinflammation*. 2011 Jul 6;8:78. doi: 10.1186/1742-2094-8-78

Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol*. 2001 Aug; 12(4):383-9.

Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Unger RE, Kriegsmann J, Kilbinger H, Wessler I. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol*. 2001 Jan; 85(1):24-8.

Konorev EA, Joseph J, Tarpey MM, Kalyanaraman B. The mechanism of cardioprotection by S-nitrosoglutathione monoethyl ester in rat isolated heart during cardioplegic ischaemic arrest. *Br J Pharmacol*. 1996 Oct; 119(3):511-8.

Koss MC. Functional role of nitric oxide in regulation of ocular blood flow. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jun 18;374(2):161-74.

Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, de Belder AJ, Thomas MR, Smith RE, Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet*. 1994 Nov 26; 344(8935):1458-60.

Ley K, Reutershan J. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2006 ;(176 Pt 2):97-133.

Lipton AJ, Johnson MA, Macdonald T, Lieberman MW, Gozal D, Gaston B. S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature*. 2001 Sep 13; 413(6852):171-4.

Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*. 2004 Feb 20; 116(4):617-28.

Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR Jr. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3; 95(5):2175-9.

Lopes de Almeida JP, Carvalho FA, Silva-Herdade AS, Santos-Freitas T, Saldanha C. Redox thiol status plays a central role in the mobilization and metabolism of nitric oxide in human red blood cells. *Cell Biol Int*. 2009 Mar;33(3):268-75. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.11.012.

Low PS, Willardson BM, Mohandas N, Rossi M, Shohet S. Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability. *Blood*. 1991 Apr 1;77(7):1581-6.

Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2013 Apr 11; 61C:473-501. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.001.

Madigan M, Zuckerbraun B. Therapeutic Potential of the Nitrite-Generated NO Pathway in Vascular Dysfunction. *Front Immunol*. 2013; 4:174. doi: 10.3389/fimmu.2013.00174.

Massoulié J, Sussman J, Bon S, Silman I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res*. 1993; 98:139-46.

McMahon TJ, Exton Stone A, Bonaventura J, Singel DJ, Solomon Stamler J. Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin. *J Biol Chem*. 2000 Jun 2; 275(22):16738-45.

- Mesquita R, Pires I, Saldanha C, Martins-Silva J. Effects of acetylcholine and spermineNONOate on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2001;25(3-4):153-63.
- Michelson MJ, Zeimal EV. Acetylcholine: An Approach to the Molecular Mechanism of Action. *Pergamon Press:Oxford.* 1973
- Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006 ;(176 Pt 1):213-54.
- Moriyama R, Lombardo CR, Workman RF, Low PS. Regulation of linkages between the erythrocyte membrane and its skeleton by 2,3-diphosphoglycerate. *J Biol Chem.* 1993 May 25; 268(15):10990-6.
- Murphy SC, Hiller NL, Harrison T, Lomasney JW, Mohandas N, Haldar K. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes. *Mol Membr Biol.* 2006 Jan-Feb; 23(1):81-8.
- Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M. Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol.* 1997 Apr; 115(4):497-503.
- Niday E, Wang CS, Alaupovic P. Kinetic evidence for the allosteric substrate inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta.* 1980 Mar 14; 612(1):67-72.
- Oliveira S de, Silva-Herdade AS, Saldanha C. Modulation of erythrocyte deformability by PKC activity. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 39(1-4):363-73.
- Oliveira S de, Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010; 44(1):63-74. doi: 10.3233/CH-2010-1253.
- Owusu BY, Stapley R, Honavar J, Patel RP. Effects of Erythrocyte Aging on Nitric Oxide and Nitrite Metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Mar 4.
- Palmer LA, Doctor A, Chhabra P, Sheram ML, Laubach VE, Karlinsey MZ, Forbes MS, Macdonald T, Gaston B. S-nitrosothiols signal hypoxia-mimetic vascular pathology. *J Clin Invest.* 2007 Sep; 117(9):2592-601.
- Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood.* 2006 Aug 1; 108(3):791-801.
- Pawloski JR, Stamler JS. Nitric oxide in RBCs. *Transfusion.* 2002 Dec; 42(12):1603-9.
- Plasenzotti R, Windberger U, Ulberth F, Osterode W, Losert U. Influence of fatty acid composition in mammalian erythrocytes on cellular aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007; 37(3):237-43.
- Polak K, Luksch A, Berisha F, Fuchsjaeger-Mayrl G, Dallinger S, Schmetterer L. Altered nitric oxide system in patients with open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2007 Apr; 125(4):494-8.
- Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett.* 1997 Oct 20; 416(2):175-8.

- Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*. 1995 May; 268(5 Pt 1):L699-722.
- Radius RL, Diamond GR, Pollack IP, Langham ME. Timolol. A new drug for management of chronic simple glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1978 Jun; 96(6):1003-8.
- Reynolds JD, Ahearn GS, Angelo M, Zhang J, Cobb F, Stamler JS. S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 23; 104(43):17058-62.
- Robinson JM, Lancaster JR Jr. Hemoglobin-mediated, hypoxia-induced vasodilation via nitric oxide: mechanism(s) and physiologic versus pathophysiologic relevance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Apr; 32(4):257-61.
- Salas E, Langford EJ, Marrinan MT, Martin JF, Moncada S, de Belder AJ. S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation and deposition in coronary artery saphenous vein grafts in vitro and in vivo. *Heart*. 1998 Aug; 80(2):146-50.
- Saldanha C. Contribution to the kinetics study of human erythrocyte acetylcholinesterase. 1985. Dissertation, University of Lisbon.
- Saldanha C, Silva AS, Gonçalves S, Martins-Silva J. Modulation of erythrocyte hemorheological properties by band 3 phosphorylation and dephosphorylation. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007; 36(3):183-94.
- Saldanha C, Teixeira P, Santos-Freitas T, Napoleão P. Timolol Modulates Erythrocyte Nitric Oxide Bioavailability. *J Clin Exp Ophthalmol*. 2013. 4:285. doi: 10.4172/2155-9570.1000285
- Sandau K, Brüne B. The dual role of S-nitrosoglutathione (GSNO) during thymocyte apoptosis. *Cell Signal*. 1996 Mar; 8(3):173-7.
- Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen WM, Tannenbaum SR. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10; 93(25):14428-33.
- Sonveaux P, Kaz AM, Snyder SA, Richardson RA, Cárdenas-Navia LI, Braun RD, Pawloski JR, Tozer GM, Bonaventura J, McMahon TJ, Stamler JS, Dewhirst MW. Oxygen regulation of tumor perfusion by S-nitrosohemoglobin reveals a pressor activity of nitric oxide. *Circ Res*. 2005 May 27; 96(10):1119-26.
- Spencer NY, Zeng H, Patel RP, Hogg N. Reaction of S-nitrosoglutathione with the heme group of deoxyhemoglobin. *J Biol Chem*. 2000 Nov 24; 275(47):36562-7.
- Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15; 89(16):7674-7.
- Stefanovic M, Puchulu-Campanella E, Kodippili G, Low PS. Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. *Biochem J*. 2013 Jan 1; 449(1):143-50. doi: 10.1042/BJ20120869.
- Tang LC. Identification and characterization of human erythrocyte muscarinic receptors. *Gen Pharmacol*. 1986; 17(3):281-5.

Tsikakos D, Schmidt M, Böhmer A, Zoerner AA, Gutzki FM, Jordan J. UPLC-MS/MS measurement of S-nitrosoglutathione (GSNO) in human plasma solves the S-nitrosothiol concentration enigma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 May 15; 927:147-57. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.01.023.

Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effect of hemoglobin oxygenation level on red blood cell deformability and aggregation parameters. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;41(3):179-88. doi: 10.3233/CH-2009-1168.

van der Vliet A, Hoen PA, Wong PS, Bast A, Cross CE. Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1998 Nov 13; 273(46):30255-62.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999 Mar; 26(3):198-205.

Williamson RC, Toye AM. Glycophorin A: Band 3 aid. *Blood Cells Mol Dis*. 2008 Jul-Aug; 41(1):35-43. doi: 10.1016/j.bcmd.2008.01.001.

Won JS, Kim J, Annamalai B, Shunmugavel A, Singh I, Singh AK. Protective role of S-nitrosoglutathione (GSNO) against cognitive impairment in rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Alzheimers Dis*. 2013; 34(3):621-35. doi: 10.3233/JAD-121786.

Wright DL, Plummer DT. Multiple forms of acetylcholinesterase from human erythrocytes. *Biochem J*. 1973 Jul; 133(3):521-7.

Yamamoto R, Bredt DS, Dawson TM, Snyder SH, Stone RA. Enhanced expression of nitric oxide synthase by rat retina following pterygopalatine parasympathetic denervation. *Brain Res*. 1993 Dec 17; 631(1):83-8.

Yawata Y. *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*, Wiley. 2003

Zabala L, Saldanha C, Martins e Silva J, Souza-Ramalho P. Red blood cell membrane integrity in primary open angle glaucoma: ex vivo and in vitro studies. *Eye (Lond)*. 1999;13 (Pt 1):101-3.

Zanini GM, Martins YC, Cabrales P, Frangos JA, Carvalho LJ. S-nitrosoglutathione prevents experimental cerebral malaria. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012 Jun;7(2):477-87. doi: 10.1007/s11481-012-9343-6.

Zhang Y, Hogg N. Formation and stability of S-nitrosothiols in RAW 264.7 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Sep;287(3):L467-74.

Zhang Y, Hogg N. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic Biol Med*. 2005 Apr 1; 38(7):831-8.

Zimmerman TJ and Kaufman HE. Timolol: a new drug for the treatment of glaucoma? In Symposium on Ocular Therapy, vol. 10, Leopold IH, editor. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1977 pp. 69-76.

Anexos

Anexo I - Concentrações de monóxido de azoto e seus metabolitos para os ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).

	TRATAMENTO		
	Controlo	ACh (10^{-5} M)	Timolol (10^{-5} M)
NO (nM)	1,164 ± 0,341	2,047 ± 0,413	1,485 ± 0,458
SNO-Hg (Intensidade de fluorescência)	14919,444 ± 8621,631	15027,000 ± 5818,670	14109,222 ± 9715,294
Peroxinitritos (μM)	240,4 ± 41,7	240,4 ± 22,0	238,8 ± 34,7
GSNO eritrocitário (μM)	6,3 ± 1,6	7,4 ± 2,5	2,7 ± 2,9
Efluxo GSNO (μM)	0,67 ± 0,78	5,22 ± 2,46	2,33 ± 1,52
Efluxo GSNO (μM) + GSNO eritrocitário (μM)	7,0 ± 1,8	12,7 ± 4,7	4,8 ± 2,9

Os valores apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão.

Anexo II - Valores de mediana e quartis para os ensaios de controlo, ACh (10^{-5} M) e timolol (10^{-5} M).

	TRATAMENTO		
	Controlo	ACh (10^{-5} M)	Timolol (10^{-5} M)
NO (nM)	1,14 (0,98 - 1,36)	2,09 (1,85 - 2,42)	1,38 (1,22 - 1,78)
SNO-Hg	9365,50 (4854,25 - 16369,75)	11996,50 (8724,00 - 17855,00)	7941,50 (5056,00 - 17309,25)
Peroxinitritos (μM)	229,78 (211,42 - 280,61)	242,41 (223,25 - 269,99)	219,80 (210,08 - 276,80)
GSNO eritrocitário (μM)	6,67 (5,56 - 7,78)	7,78 (6,67 - 11,11)	1,11 (1,11 - 3,33)
Efluxo GSNO (μM)	0,00 (0,00 - 1,11)	5,56 (3,33 - 6,67)	2,22 (0,83 - 2,22)
Efluxo GSNO (μM) + GSNO eritrocitário (μM)	6,67 (6,39 - 8,06)	11,66 (9,72 - 15,84)	3,33 (3,33 - 5,84)

Os valores apresentados correspondem à mediana e quartis.